

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Juni 2001 (21.06.2001)

PCT

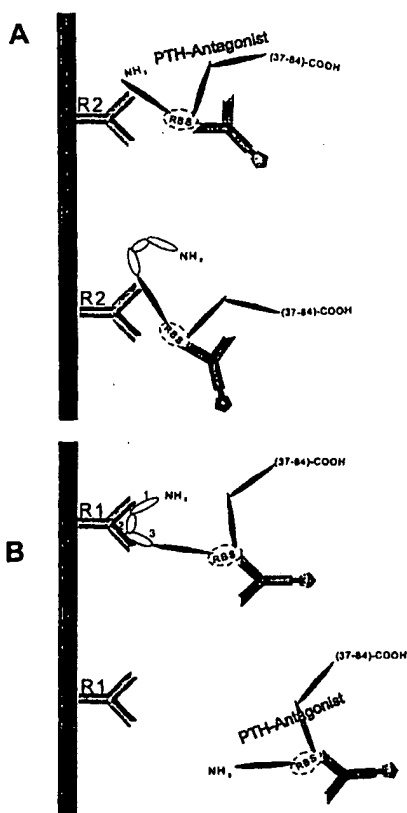
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/44818 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/74** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **IMMUNDIAGNOSTIK AG** [DE/DE]; Wiesenstrasse 4, 64625 Bensheim (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/12911**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
18. Dezember 2000 (18.12.2000) (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ARMBRUSTER, Franz, Paul** [DE/DE]; Immundiagnostik AG, Wiesenstrasse 4, 64625 Bensheim (DE). **MISSBICHLER, Albert** [AT/AT]; Marrokanergasse 3/62, A-1030 Wien (AT). **SCHMIDT-GAYK, Heinrich** [DE/DE]; Mittelhabacherstrasse 10, 67434 Neustadt-Hambach (DE). **ROTH, Heinz-Jürgen** [DE/DE]; Kallstadter Strasse 3, 68549 Hivesheim (DE).
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
199 61 350.8 17. Dezember 1999 (17.12.1999) **DE**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE BIOLOGICALLY EFFECTIVE PARATHYROID HORMONE ACTIVITY IN A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER BIOLOGISCH WIRKSAMEN PARATHORMON-AKTIVITÄT IN EINER PROBE



(57) Abstract: The invention relates to an immunoassay for determining the parathyroid hormone activity in a sample and to a method for diagnosing, finding the causes for and treating disorders of the calcium metabolism, osteopathies and hyper- or hypoparathyreoses. The parathyroid hormone activity is measured by means of an antibody that binds to an epitope in the area of the receptor binding structure 15 to 22 of the parathyroid hormone, and an antibody that recognizes whether the aminoterminal end 1 to 3 of the parathyroid hormone has remained intact. The inventive assay allows taking into account the antagonist properties of some parathyroid hormone fragments.

(57) Zusammenfassung: Immunoassay zur Bestimmung der Parathormon-Aktivität in einer Probe sowie die Diagnose, Ursachenfindung und Behandlung von Calciumstoffwechselstörungen, Osteopathien und Hyper- oder Hypoparathyreoidismen. Die Parathormon-Aktivität wird gemessen mit Hilfe eines Antikörpers, der an ein Epitop im Bereich der Rezeptorbindungsstruktur 15 bis 22 des Parathormons bindet, und einem Antikörper, der erkennt, ob das aminoterminal Ende 1 bis 3 des Parathormons intakt geblieben ist. Der Assay erlaubt eine Berücksichtigung der antagonistischen Eigenschaften mancher Parathormonfragmente.

WO 01/44818 A2



(74) Anwälte: BENEDUM, Ulrich, Max usw.; Haseltine Lake Partners, Rosenheimer Str. 30, 81669 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER BIOLOGISCH WIRKSAMEN PARATHORMON-AKTIVITÄT IN EINER PROBE

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Parathormon-Aktivität in einer Probe. Die Erfindung betrifft insbesondere die immunologische Bestimmung der Aktivität von Parathormon (PTH) und seinen Fragmenten in einer Körperflüssigkeit zur Diagnose, Ursachenfindung und Behandlung von Calciumstoffwechselstörungen, Osteopathien und Hyper- oder Hypoparathyreoidismen.

10

Humanes Parathormon (siehe SWISS-PROT: P01270, PTHY-HUMAN) ist ein lineares Peptid von 84 Aminosäuren (MW 9500 Da) der Nebenschilddrüse (Glandulae parathyroideae). Es erhöht den Calcium- und vermindert den Phosphatgehalt des Blutes und ist an der Mobilisierung des extrazellulären Hydroxylapatits der Knochen beteiligt.

15

Der PTH-Gehalt des Blutes ist daher ein wichtiger diagnostischer Parameter bei Patienten mit gestörtem Calciumstoffwechsel und seine Kenntnis erforderlich zur Klärung von 1) Vorliegen und Ausmaß eines Hyper- oder Hypoparathyreoidismus, 2) der Quantifizierung der Osteoblastenaktivität, 3) der Quantifizierung der Osteoklastenaktivität, 4) der Absicherung der Versorgung mit Vitamin-D und aktiven Vitamin-

20

D-Metaboliten, 5) der Abschätzung einer Aluminiumbelastung, 6) der Abschätzung eines eventuellen Östrogenmangels bei postmenopausalen Dialysepatientinnen, 6) der notwendigen Steroid- oder Cyclosporingabe nach Nierentransplantationen, 7) des Behandlungsbedarfs und der Vorbeugung von Knochenmarksveränderungen, urämischen Zuständen und chronischem Nierenversagen.

25

Die Bestimmung der im Blut wirksamen PTH-Aktivität ist problematisch, da das Peptidhormon in der Zirkulation und von der Leber rasch in aktive und inaktive Fragmente zerlegt wird, beispielsweise durch Spaltung im Bereich der Aminosäuren 34 bis 37. Zudem liegt die physiologische Konzentration von intaktem humanen PTH

30

(hPTH) im Blutplasma nur bei etwa 1 bis 5 pMol/L.

Die Bestimmung von intaktem hPTH(1-84) erfolgt im Stand der Technik durch den immunologischen Nachweis von zwei voneinander weit entfernten Epitopen auf dem Peptid. Es gibt jedoch trotzdem viele Patienten mit acht- bis zehnfach erhöhten Ge-

halten an intaktem PTH(1-84) im Blut und niedrignormaler knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (Ostase), das heißt, frei von Symptomen einer überhöhten PTH-Aktivität. Erklärt wird dies durch falsche Messwerte oder eine PTH-Resistenz der Osteoblasten, beispielsweise durch eine genetisch verminderte Expression von PTH-Rezeptoren. Weiter erschwert wird die Bestimmung der wirksamen PTH-Aktivität dadurch, dass einige PTH-Fragmente eine Aktivität vergleichbar intaktem hPTH(1-84) besitzen (siehe EP-A 0 349 545), andere PTH-Fragmente wiederum antagonistisch wirken (siehe LePage et al (1998), Clinical Chemistry, 44:4, pp805-809; Schmidt-Gayk et al. (1999) Osteologie forum, 5, pp48-58, sowie Verweise). So weiß man, dass die Fragmente hPTH(3-34) und hPTH(7-34) die Wirkungen des PTH inhibieren (Suva et al. (1987) Science, 237, 893ff; EP 0 451 867).

Die WO 96/10041 lehrt, dass Antikörper gegen aminoterminal Epitope des PTH biologisch aktives PTH erkennen und dass bei einem Verlust der aminoterminalen Aminosäuren Serin und Valin die Aktivität verloren geht.

Mägerlein et al beschreiben in Arzneim.-Forsch./Drug Res. 48(II), pp197-204 (1998) einen immunoenzymometrischen Assay für die Bestimmung der Konzentration von injiziertem PTH-Fragment 1-37 bei Pharmakokinetikstudien an Hunden. Der Messbereich des Assays reicht von 100 bis 4 pMol/L und endet oberhalb der normalerweise im Serum vorliegenden physiologischen PTH-Gehalte.

Die wahre biologisch wirksame PTH-Aktivität in einer Probe kann zurzeit, wenn überhaupt, nur über die Wirkung auf ein zelluläres System wie bspw. Pheochromozytomzellen (PC-12) bestimmt werden.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Bestimmung der gesamten wirksamen Parathormon-Aktivität in einer Probe zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren nach Anspruch 1. Weitere vorteilhafte Ausführungsformen des Verfahrens sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben. Die Erfindung betrifft zudem ein Testsystem sowie Verfahren zur Diagnose und Ausmaß eines Hypo- oder Hyperparathyreoidismus sowie der Ursachenfindung von Calciumstoffwechselstörungen, Osteopathien, Nierenversagen und Erkrankungen,

die von einer gestörten Homeostase des Calcium- und Phosphatgehalts des Bluts herrühren.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der biologisch wirksamen PTH-Aktivität in einer Probe ist gekennzeichnet durch die Schritte: (i) Umsetzen der Probe mit einem Antikörper, der ein Epitop auf dem PTH bindet, das im Bereich der Bindungsstruktur an den PTH-Rezeptor liegt; (ii) Umsetzen der Probe mit einem Antikörper, der ein Epitop erkennt, das von den terminalen Aminosäuren 1 bis 3 des PTH gebildet wird; (iii) Bestimmen der Menge der Moleküle, die von beiden Antikörpern erkannt werden; und (iv) Berechnen der biologisch wirksamen PTH-Aktivität in der Probe.

Die vorgenannten Antikörper erkennen bevorzugt Epitope des humanen PTH. Der Antikörper gegen die Rezeptor-Bindungsstruktur bindet bevorzugt ein Epitop, an dem mindestens eine der Aminosäuren 15 bis 22 des humanen PTH beteiligt ist. Die Erfindung umfasst zudem ein Verfahren, bei dem ein erster Antikörper an eine feste Phase gebunden ist. Der zweite Antikörper kann eine Markierung tragen oder konjugiert sein mit einem Enzym wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase. Das Verfahren erfolgt erfindungsgemäß in einem an sich bekannten Immunoassay, vorzugsweise in einem ELISA, IEMA, ILMA oder LIA. Die Bindung der beiden Antikörper an das PTH erfolgt bevorzugt in Gegenwart von 0,05 bis 0,1 Gew.% eines milden Detergens wie TweenTM-20 oder TritonTMX-100, so dass eine Faltung des aminoterminalen Epitops PTH(1-3) zur PTH-Rezeptorbindungsstruktur verhindert ist bzw. um das aminoterminal Epitop PTH(1-3) für die Bindung des Antikörpers zugänglich zu halten. Da für die biologische Aktivität des PTH sowohl die Rezeptorbindungsstruktur als auch das aminoterminal Epitop PTH(1-3) nötig sind, können diese beiden Strukturen vermutlich miteinander wechselwirken. Durch die Gegenwart eines milden Detergens kann die Empfindlichkeit und Genauigkeit des Assays deutlich verbessert werden.

In einer Ausführungsform des Verfahrens wird ein bekanntes Aliquot der Probe zudem mit Antikörpern umgesetzt, die an die PTH-Sequenzen zwischen Aminosäure 4 bis 14 und 15 bis 37 binden. Die Zahl der Moleküle in einer Probe, die Antikörper gegen das Epitop PTH(1-3) und die Rezeptorbindungsstruktur des PTH binden, und die Zahl der Moleküle, die Antikörper gegen die PTH-Bereiche 4 bis 14 und 15 bis 37 binden,

werden dann zueinander in Beziehung gebracht und die biologisch wirksame PTH-Aktivität ermittelt.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Diagnosesystem zur Bestimmung der PTH-Aktivität
5 in einer Probe, das gekennzeichnet ist durch Antikörper, die spezifisch das PTH-Epitop mit den Aminosäuren 1 bis 3 erkennen und Antikörper, die an den Bereich der PTH-Rezeptorbindungsstruktur binden. In einer Ausführungsform weist das Diagnosesystem zudem Antikörper auf, die spezifisch an den Bereich zwischen Aminosäure 4 und 14 binden. In einer weiteren Ausführungsform beinhaltet das System Antikörper,
10 die an den Abschnitt zwischen Aminosäure 24 und 37 des Parathormons binden oder an den mittregionalen Bereich (53 bis 68) oder den C-terminalen (53 bis 84) Bereich des Peptidhormons.

Das erfindungsgemäße Verfahren berücksichtigt im Gegensatz zu früheren
15 Immunoassays die PTH-Aktivität der nicht-intakten PTH-Fragmente und dass scheinbar intaktes PTH biologisch inaktiv ist, wenn die letzte oder die letzten beiden aminoterminalen Aminosäuren des Peptidhormons fehlen. Auch die antagonistische Aktivität einiger PTH-Fragmente geht in die Bestimmung ein, indem bei dem Verfahren nicht nur die agonistischen, sondern auch die antagonistischen PTH-Fragmente bestimmt
20 werden können. Die antagonistische Aktivität leitet sich ab aus dem Überschuss von PTH-Rezeptor-Bindungsstruktur zu intaktem PTH-Aminoterminus, d.h. aus der Zahl der PTH-Fragmente, die zwar die Bindungsstruktur für den PTH-Rezeptor enthalten, aber kein intaktes aminoterminal Ende haben. PTH-Fragmente, die weder eine Rezeptor-Bindungsstruktur mit den Aminosäuren 15 bis 22 noch ein intaktes aminotermi-
25 nales Epitop PTH(1-3) aufweisen, besitzen keine agonistische oder antagonistische Aktivität.

Herkömmliche immunologische Assays auf sogenanntes "truly intact" hPTH(1-84) oder hPTH(1-37) geben falsch hohe Aktivitätswerte, da nur aus dem Vorhandensein
30 von funktionell unbedeutenden Epitopen auf eine physiologische Aktivität geschlossen wird. Sie beachten nicht, dass die richtige Faltung bzw. die Bindung an den PTH-Rezeptor von einem intaktem Aminoterminus mit den Aminosäuren H₂N-Ser¹-Val² abhängig ist. Die in herkömmlichen Assays oft als "aktives" PTH bestimmten Fragmente hPTH(7-84), hPTH(3-84) oder hPTH(4-37) besitzen aber keine oder anta-

gonistische Aktivität. Assays auf der Basis von Antikörpern gegen den mittregionalen (53-68) oder C-terminalen (53-84) Abschnitt übersehen hingegen biologisch aktive PTH-Fragmente des Typs hPTH(1-37), hPTH(1-32 ~ 36) oder hPTH(1-38).

- 5 Auch mit Immunoassays auf der Grundlage von Antikörpern gegen den aminoterminalen Bereich des PTH bzw. gegen Peptide aus der hPTH(1-37)-Sequenz werden falsch Aktivitäten ermittelt, da einerseits die antagonistische Aktivitäten verschiedener Fragmente nicht erfasst wird und andererseits kein positiver Nachweis der biologisch aktiven Struktureinheit erfolgt. Mit polyklonalen Antikörpern oder Antiseren gegen
10 das aminoterminal Peptid mit den Aminosäuren 1 bis 5 oder 6, werden sogar teilweise antagonistisch wirkende PTH-Fragmente als aktive PTH-Fragmente erkannt.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt somit dem Arzt einen PTH-Aktivitätswert zur Verfügung, der die physiologische Wirkung der PTH-Fragmente beschreibt. So gibt
15 es Patienten mit Hyperparathyreoidismus, die normale oder verminderte Gehalte an intaktem hPTH(1-84) im Serum haben. Der Hyperparathyreoidismus kann dann darauf beruhen, dass diese Patienten die gleichfalls aktiven PTH-Fragmente hPTH (1-37) und hPTH (1-38) in den Blutstrom sezernieren, so dass sie an einer überhöhten PTH-Aktivität und deren Folgen leiden.

20 Weitere Vorteile, Merkmale und Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den nachstehenden Beispielen und den anliegenden Zeichnungen. Es zeigt:

Fig. 1 eine Prinzipdarstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens;

25 Fig. 2 ein Vergleich der aminoterminaler PTH-Sequenzen und der Rezeptor-Bindungsstruktur von Mensch, Rind, Schwein und Hund;

Fig. 3 eine Analyse der Bindungsepitope von monoklonalen Antikörpern gegen die
30 Rezeptor-Bindungsstelle des PTH und deren Kreuzreaktion mit benachbarten PTH-Fragmenten;

Fig. 4a,b eine Analyse der Kreuzreaktion mit verschiedenen hPTH-Fragmenten in einem immunoenzymometrischen Assay;

Fig. 5 eine Standardkurve des erfindungsgemäßen LIA-Assays zur Bestimmung der wirksamen PTH-Aktivität in einer Probe.

- 5 Siehe Figur 1 mit dem Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Antikörper gegen das aminoterminal Eptop des humanen PTH mit den Aminosäuren H₂N-Ser¹-Val²-Ser³ werden gewonnen, indem man eine Immunreaktion gegen eines der nach-
genannten Peptide hervorruft.
- 10 SEQ Nr. 1:
H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH
- SEQ Nr. 2:
H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH
- 15 SEQ Nr. 3:
H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH
- SEQ Nr. 4:
20 H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH
- SEQ Nr. 5:
H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH
- 25 SEQ Nr. 6:
H₂N-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH

Die Synthese dieser Peptide erfolgt in bekannter Weise bevorzugt auf ein Lysin-Gerüst an einem Wang-Harz. Hierzu wird zunächst an eine an Wang-Harz gebundene C-terminale Aminosäure in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH an-
gekoppelt. Durch Abspaltung der Schutzgruppen mit Piperidin werden acht freie
30 Aminofunktionen erhalten, an denen die aminoterminal Sequenz des human Parathormons synthetisiert werden kann.

- Das Wang-Harz mit der aminoterminalen PTH-Aminosäuresequenz kann dann direkt - bevorzugt zusammen mit komplettem Freundschem Adjuvans - für eine Immunisierung in ein Tier injiziert werden, bspw. in Maus, Ratte, Kaninchen oder Ziege. Das aminoterminal PTH-Peptid kann vor einer Immunisierung auch erst abgespalten, isoliert und mit einem Trägerprotein wie Ovalbumin, Rinderalbumin, Thyreoglobulin oder Hämocyanin koppelt werden, bspw. mit Dicyclohexylcarbodiimid. Nach mehreren Booster-Immunisierungen wird die Immunglobulin-Fraktion isoliert, die einen Antikörpertiter gegen das aminoterminal PTH-Peptid aufweist.
- 10 Mit den vorstehend genannten aminoterminalen Peptiden werden regelmäßig Antikörper erhalten, die ein Epitop der ersten beiden aminoterminalen Aminosäuren des hPTH erkennen. Eine Fraktion mit Antikörpern rein gegen das aminoterminal Epitop hPTH(1-3) kann durch Affinitätschromatographie gewonnen werden, wobei an eine feste Phase, bspw. an Wang-Harz oder Polystyrol-Beads, ein hPTH-Peptid mit intaktem aminoterminalen Ende gekoppelt ist. Die gegen das aminoterminal Ende PTH(1-3) gerichteten Antikörper werden daran gebunden, gewaschen und eluiert. Das Eluat wird schließlich über eine zweite Säule geklärt, bei der das an die feste Phase gekoppelte hPTH-Peptid kein intaktes aminoterminal Epitop aufweist, bspw. wie in den nachstehenden Peptidsequenzen SEQ Nr. 7 und SEQ Nr. 8.
- 20
- SEQ Nr. 7
 $\text{H}_2\text{N-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{---Träger}$
- SEQ Nr. 8
- 25 $\text{H}_2\text{N-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{---Träger}$
- 30 In an sich bekannter Weise können auf diesem Weg auch monoklonale Antikörper gegen das aminoterminal Epitop des PTH gewonnen werden. Polyklonale Antiseren gegen das N-terminale hPTH-Epitop sind aber bevorzugt. Es versteht sich, dass die Schritte der vorstehend beschriebenen Reinigung vertauscht und die zum Aufreinigen und Klären des Serums verwendeten PTH-Peptide länger oder kürzer sein können. Es muss nur das aminoterminal Epitop hPTH(1-3) in einem Fall intakt vorliegen.

Für die Gewinnung des zweiten Antikörpers gegen die Sequenz der Rezeptorbindungsstelle des PTH wird intaktes hPTH(1-84) oder biologisch aktives hPTH(1-37) synthetisiert, an ein Trägerpeptid gekoppelt und mit komplettem Freundschens Adjuvans in ein Tier, bspw. in Maus, Ratte, Kaninchen oder Ziege, injiziert.

5

SEQ Nr. 9

Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-
Ser¹⁷-Met¹⁸-Glu¹⁹-Arg²⁰-Val²¹-Glu²²-Trp²³-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-
His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷

10

Eine Kopplung an ein Trägerpeptid ist für die Erzeugung einer Immunreaktion nicht unbedingt erforderlich, da die PTH-Sequenzen zwischen Mensch, Rind, Schwein und Ratte insbesondere im Bereich der Rezeptorbindungsstelle zwischen Position 15 und 22 variieren und somit antigen sind (siehe Fig. 2). Gegenüber dem humanem PTH(1-37)-Fragment unterscheidet sich bspw. das bovine PTH in den Positionen 1 (Ala), 7 (Phe) und 16 (Ser), Ratten-PTH in den Positionen 1 (Ala), 16 (Ala), 18 (Val) und 36 (Ser), porcines PTH in den Positionen 16 (Ser) und 18 (Leu) sowie canines PTH in den Position 7 (Ser) und 16 (Ser) (Heinrich G. et al (1984) J. Biol. Chem. 259:3320-3329; Kronenberg H.M. et al (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4981-4985; Schmelzer H.-J., et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6740-6740; Rosol T.J et al. (1995) Gene 160:241-243). Die Kopplung an einen Träger empfiehlt sich für die Immunisierung, da die genannten Peptide nicht nur immunogen, sondern auch biologisch aktiv sein können.

15

20

25

30

Die Synthese von hPTH(1-37) erfolgt wie in Beispiel 2 der WO 91/06564 beschrieben. Die vorgenannten Peptide und ihre Derivate können auch durch Genexpression in einem geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismus hergestellt und chromatographisch aufgereinigt werden. Neben dem vorgenannten Peptid sind auch die Peptide hPTH(1-32), hPTH(1-33), hPTH(1-34), hPTH(1-38) und andere biologisch aktive hPTH-Fragmente für die Gewinnung von Antikörpern gegen die Rezeptorbindungssequenz des hPTH geeignet.

Nach mehreren Immunisierungsboostern mit aufgereinigtem hPTH-Peptid oder Fragment wird dann die Immunglobulinfraktion aus dem Serum des immunisierten Tieres isoliert

und auf deren Bindung an die Rezeptorstelle des hPTH getestet. Hierzu wird das nachstehende Heptapeptid hPTH(15-22)

SEQ NR. 9

5 Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-Glu¹⁹-Arg²⁰-Val²¹-Glu²²---Träger

auf einem makroskopischen Träger wie Polystyrol-Beads oder Polystyrol-Pins synthetisiert und Antikörper, die spezifisch die Rezeptorbindungsstruktur des hPTH binden, durch Affinitätschromatographie isoliert. Mit Hilfe der Peptid-Pin-Technik
10 können so auch monoklonale Antikörper gegen die Rezeptorbindungsstruktur des PTH gefischt und Klone, deren Antikörper die Rezeptorbindungsstruktur erkennen, vereinzelt werden. Es versteht sich, dass anstelle des o.g. Heptapeptids auch ein Hexapeptid oder wenig längere Sequenzen von der Rezeptorbindungsstelle verwendet werden können.

15

Mit den Antikörpern gegen das N-terminale Epitop des hPTH(1-3) und die Rezeptorbindungsstruktur hPTH(15-22) stehen Antikörper zur Verfügung, welche die funktionell aktive Struktur erfassen.

20 Erfindungsgemäß erfolgt der Immunoassay auf die aktive Struktur des hPTH unter leicht denaturierenden Bedingungen, so dass im entfalteten Peptid beide Epitope für eine Bindung an die Antikörper frei sind. Dies erfolgt durch den ansonsten unüblichen Zusatz eines Detergens wie Tween-20 oder Triton-X-100 im Bindungspuffer. Die Detergentien werden bevorzugt in einer Menge von 0,01 bis 1 Gew.%, besonders
25 bevorzugt in einer Menge von 0,1 bis 0,3 Gew.%, in den Bindungspuffer gegeben.

Antagonistische hPTH-Fragmente sind gekennzeichnet durch eine PTH-Rezeptorbindungsstelle und das Fehlen eines intakten aminoterminalen Epitops hPTH(1-3). Die antagonistische Aktivität einer Probe ist somit proportional zur Zahl der PTH-Fragmente, welche die Rezeptorbindungsstelle zwischen Position 15 und 22 enthalten,
30 aber von Antikörpern gegen das aminoternale Epitop hPTH(1-3) nicht gebunden werden. Die antagonistische Aktivität lässt sich also ermitteln aus der Differenz zwischen der Zahl der Moleküle, die vom Antikörper-Doppel gegen die Rezeptorbindungsstelle und den Aminoterminal hPTH(1-3) erkannt werden, und der

Zahl der Fragmente, die vom Antikörper-Doppel gegen die Rezeptorbindungsstruktur (oder einem N-terminalen Epitop zwischen Aminosäure 24 und 37) und einem Epitop im Bereich der Aminosäuren 4 und 14 erkannt wird. Die letztgenannte Größe ist in der Praxis gleich der Zahl der hPTH-Fragmente, die vom Antikörper-Doppel gegen die Abschnitte hPTH(9-18) und hPTH(24-34) erkannt wird, nicht aber von Antikörpern gegen das hPTH(1-3)-Epitop.

Die Antikörper gegen den Bereich hPTH(4-14) fallen bei der Aufreinigung der Antikörper gegen das hPTH(1-3)-Epitop an. Sie sind in der Antikörperfraktion enthalten, die an das aminoterminal Peptid hPTH(2-10) mit unvollständigem hPTH-End-Epitop (siehe oben) binden. Derartige Antikörper können auch spezifisch hergestellt werden, z.B. wie in der WO 96/10041 oder in Tampe et al. (J. Immunoassay (1992), 13(1), pp. 1-13) beschrieben. Damit sich die Antikörper gegenseitig nicht stören, kann es hierbei vorteilhaft sein, zwei Antikörper mit etwas weiter auseinander liegenden Bindungsstellen auf dem hPTH(1-37) auszuwählen, bspw. wie oben als Alternative angegeben. Liegen die Bindungsstellen zu weit auseinander oder weit C-terminal der Rezeptorbindungsstelle zwischen Position 15 und 22, so besteht die Gefahr, dass auch nicht-inhibierende hPTH-Fragmente als Antagonisten erfasst werden.

Der erfindungsgemäße Immunoassay der biologischen PTH-Aktivität kann im Übrigen mit bestehenden PTH-Immunoassays kombiniert werden. So kann bei einigen Diagnosen angezeigt sein, nicht nur die biologische Aktivität des hPTHs zu messen, sondern auch die Menge und Verteilung der hPTH-Moleküle einer bestimmten Länge. Das heißt, es kann vorteilhaft sein, einen hPTH-Assay zu haben, der neben den Antikörpern gegen das aminoterminal hPTH(1-3) auch Antikörper mit mittregionaler (53-68) oder C-terminaler (53-84) Spezifität verwendet. Mit einem solchen PTH-Assay kann dann die effektive PTH-Aktivität in Beziehung gesetzt werden zu einzelnen PTH-Molekülen bestimmter Länge. Hierdurch lassen sich insbesondere die Ursache bestimmter Hyper- und Hypoparathyreoidismen erklären. Erfindungsgemäß umfasst der PTH-Aktivitätsassay auch die zusätzliche Bestimmung von hPTH-Molekülen mit einem intakten Carboxyterminus und Antikörper gegen den mittregionalen oder C-terminalen Bereich des hPTH.

Das Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von PTH und seinen Fragmenten in einer Probe kann verwirklicht werden als EIA, ELISA, RIA, IRMA, LIA oder ILMA, FIA oder IFMA, als ein manuelles Testsystem oder bevorzugt in einer auf Automaten angepasste Version in Flüssigphasen- oder Festphasentechnik.

5

BEISPIELE

Beispiel 1 *Antikörper gegen das hPTH(1-3)-Epitop*

10

Zunächst wurde eine dreifache Lysin-Verzweigung auf einem Wang-Harz hergestellt. Hierzu wurde an C-terminales Alanin, gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppen erfolgte dann mit 20% Piperidin und 2% 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in NN-Dimethylformamid, NN-Dimethylacetamid. An die freien Aminogruppen erfolgte dann

15 die Synthese des N-terminalen Hexapeptids hPTH(1-6) in an sich bekannter Weise durch eine Festphasensynthese und Kopplung der C-terminalen Aminosäuren mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid als Kopplungsmittel. Das Peptid

20 $\text{H}_2\text{N-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{--(3 x Lys)-Ala-Träger}$

wurde dann vom Träger abgespalten und deblockiert bei Raumtemperatur durch 30 bis 90 Minuten Behandeln mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol und Phenol enthielt. Das Peptid wurde mit Trifluoressigsäure gewaschen, mit tert-

25 Butylmethylether aus wässriger Lösung ausgefällt. Das Rohprodukt wurde über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10 μm , Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30% Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCL; Gradient: 10-80% in 60 Minuten ausgefällt) chromatographisch aufgereinigt.

30 1 mg aufgereinigtes Peptid hPTH(1-6) wurde dann in wässriger Lösung bei Raumtemperatur mit der Carbodiimid-Methode an 10 mg Rinderserumalbumin gekoppelt und das gekoppelte Peptid mit Isopropanol aus der wässrigen Lösung gefällt. Das Peptide wurde in PBS aufgenommen und aliquotiert.

Für die Erstimmunisierung wurde 125 µg Peptid-Träger-Konjugat in 250 µl PBS gelöst, mit einem doppelten Volumen komplettes Freundsches Adjuvans emulgiert und die Emulsion in ein Kaninchen an verschiedenen Stellen, in mehreren Einheiten subcutan injiziert. Nach 2 und 4 Wochen folgten weitere Booster-Injektionen mit Peptid und
5 inkomplettem Freundschem Adjuvans.

Nach 6 Wochen wurden 50 ml Blut entnommen und Antikörper gegen das aminoterminal hPTH(1-3)-Epitop gewonnen durch sequentielle Affinitätschromatographie durch Bindung an Protein-A, Bindung an das Peptid hPTH(1-6) und Klären
10 über eine hPTH(2-10)-Peptidsäule. Im letzten genannten Schritt fielen nach der weiteren Eluierung auch Antikörper gegen hPTH(3-6) an, die zum Nachweis antagonistischer PTH-Fragment verwendet werden können.

15 Beispiel 2 *Antikörper gegen die Rezeptor-Bindungsstruktur*

Die Synthese von hPTH(1-37) erfolgte wie in Beispiel 2 der WO 91/06564 beschrieben. Für die Immunisierung wurde 25 µg Peptid hPTH(1-37), gebunden an Wang-Harz, in 50 µl PBS intraperitoneal in eine Maus injiziert. Nach 2 und 4 Wochen erfolgte ein
20 Boostern mit je 50 µl Peptid hPTH(1-37) an Wang-Harz. Es wurden in an sich bekannter Weise monoklonale Antikörper-Klone hergestellt und die verschiedenen gepoolten Klone an hPTH(15-22)-Heptapeptid, synthetisiert auf Polystyrol-Pins (siehe Tampe et al., J. Immunassay (1992), 13(1), pp. 1-13), getestet. Bei vier Klonen wurden
25 die Bindungsepitope mit hPTH(1-10), hPTH(9-18), hPTH(16-24) und hPTH(24-37) nachkartiert und auf eventuelle Kreuzreaktivität untersucht. Figur 3 zeigt eine Analyse der monoklonalen Antikörper gegen die Rezeptor-Bindungsstelle des PTH und sowie deren Kreuzreaktion mit den weiteren PTH-Fragmenten.

30 Beispiel 3 *Untersuchung der Kreuzreaktivität zu nicht-aktiven Fragmenten*

Synthetisches hPTH(1-84) (Bachem AG) und verschiedene hPTH-Fragmente mit und ohne intaktem aminoterminalen Endepitop wurden in gleichen Mengen Serum gelöst und die resultierenden PTH-Aktivitäten bzw. die Wiederfindung der biologisch aktiven PTH-Fragmente in einem immunoenzymometrischen Assay (IEMA) bestimmt. Als

Primärantikörper wurde der monoklonale Antikörper mAK 13/C6315 gegen die Rezeptorbindungsstelle eingesetzt und an die feste Phase gebunden. Der Sekundärantikörper war polyklonales Kaninchen-anti-hPTH(1-3)-IgG. Die Farbreaktion erfolgte mit Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG und dem ABTS-System von Roche Diagnostics, Mannheim (ABTS = 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]). Es wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen.

Figuren 4a und b zeigen die Kreuzreaktion mit verschiedenen hPTH-Fragmenten in zwei verschiedenen Versuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass PTH-Fragmente ohne die letzten zwei aminoterminalen Aminosäuren im Test nicht erkannt werden und alle aktiven PTH-Fragmente im Wesentlichen eine einheitliche Kurvenschar bilden. Unterschiede beruhen auf differierenden Reinheitsgraden der Präparationen, Einwägungenauigkeiten und der Schwierigkeit einer genauen Mengenbestimmung bei Peptiden.

15

Beispiel 3 *Antikörper gegen hPTH(4-14), hPTH(7-14) und hPTH(24-37)*

Es wurden zwei polyklonale Antiseren aus Ziege und Maus sowie zwei monoklonale Antikörper, welche die hPTH-Region zwischen Aminosäuren 7 und 14 erkennen, wie von Tampe et al. (J. Immunoassay (1992) 13(1), pp1-13) beschrieben, hergestellt. Die Antikörper gegen die hPTH(24-37)- und die hPTH(4-14)-Region wurden wie in der WO 96/10041 beschrieben hergestellt.

25

Beispiel 4 *Bestimmung der wirksamen PTH-Aktivität in einer Probe*

Um die Nachweisgrenze zu erniedrigen wurden die Konzentrationsverhältnisse optimiert und als Detektionssystem alkalische Phosphatase in Verbindung mit Lumineszenzverfahren eingesetzt. Bei Verwendung von Peroxidase und einem Lumineszenzverfahren kann im Blutplasma vorhandene Pseudoperoxidase die Nachweisgrenze nachteilig heben.

30

(i) *Beschichten einer Mikrotiterplatte mit monoklonalem Antikörper gegen die PTH-Rezeptorbindungsstruktur*

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 1,0 µg MAk 77/78 (Subklon gegen Rezeptorbindungsstelle hPTH (15-22)) gegeben, gelöst in 250 µl 60 mM NaHCO₃, pH 9,6, und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die MAk-Lösung in den Vertiefungen wurde entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit 200 µl Waschpuffer (PBS, pH 7,4 mit 0,05% Tween-20) gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 250 µl Assaypuffer gegeben. Für den Assaypuffer wurde 5 g Casein in 100 ml 0,1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4, mit 0,1 Gew.% Triton™-X 100 auf 1 L Volumen aufgefüllt. Die Lösung wurde eine Stunde gekocht, das Volumen mit destilliertem Wasser auf einen Liter ergänzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und 0,1 g Thimerosal zur Vermeidung von Mikrobenwachstum zugefügt. Die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Assaypuffer inkubiert, dann der Assaypuffer entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

(ii) *Probenvorbereitung*

Es wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen gesammelt (ca. 1,5 bis 2 mg K₂EDTA pro Milliliter Blut), geschüttelt, und nach einer Gerinnungszeit von 10 bis 15 Minuten mit 1800 x G 10 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde 1:1 mit Assaypuffer verdünnt und bei -20°C bis zum Test aufbewahrt. Enthielten die Proben mehr als 800 pMol/L PTH, wurde der Überstand 1:10 mit Assaypuffer verdünnt. Vor einem Einsatz in den ELISA wurden die Proben kurz bei maximaler Drehzahl zentrifugiert.

(iii) *Bindung von intaktem PTH(1-84) und PTH-Fragmenten mit Rezeptor-Bindungsstruktur*

Es wurde jeweils 100 µl verdünnter EDTA-Serumüberstand in Assaypuffer eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in die vorbereiteten Vertiefungen unter Rütteln inkubiert. Dann wurden die Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen.

(iv) *Bestimmung der Bindung von aktivem PTH*

Es wurde jeweils 100 µl affinitätsgereinigtes Kaninchen-anti-PTH(1-3-Epitop)-Antiserum

- (1:10 000 verdünnt in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000) in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde im Dunkeln und unter Rütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit 100 μ l anti-Kaninchen-IgG, fc-spezifisch, kreuzabsorbiert und konjugiert mit alkalischer Phosphatase (1:20 000 verdünnt in Waschpuffer). Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Antikörper-Lösungen abgenommen und eine jede Vertiefung fünfmal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 100 μ l Lumi-Phos™ Plus [gebrauchsfertige Lösung mit 4-Methoxy-4-(3-phosphatphenyl)spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan]-Dinatriumsalz und zugehörigem Enhancer (Lumigen, Michigan, US) in 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer (pH 9.6)] in die Vertiefungen gegeben. Die Messung der Lumineszenz erfolgt im Anschluss bei 470 nm in einem Luminometer.
15. Als Standard wurden Lösungen von PTH(1-84) in Assaypuffer mit folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0, 0,1, 1, 10, 100 und 1000 pMol/L. Die Standardkurve mit alkalischer Phosphatase für die Nachweisreaktion zeigt, dass dieses System die Bestimmung von einigen Hunderstel pMol PTH pro Liter erlaubt.
- 20 Bei der Verwendung von Peroxidase für die Nachweisreaktion wurde Lumigen™ PS-1 als Substrat verwendet. Kurz beschrieben wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte jeweils fünfmal mit 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Dann wurde 50 μ l Standard bzw. Probe in die Vertiefung pipettiert und schließlich 50 μ l frisch 1:500 verdünnter zweiter anti-hPTH(1-3)-Antikörper. Es wurde über Nacht bei 2 bis 8 °C mit sanftem Rütteln inkubiert, der Inhalt der Vertiefungen abgenommen und die Vertiefungen jeweils fünfmal mit 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurde 100 μ l POD-Antikörper-Konjugat (anti-Kaninchen-IgG fc-spezifisch, kreuzabsorbiert und konjugiert mit Peroxidase; 1:20 000 verdünnt in Waschpuffer) zugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rütteln inkubiert, die Lösungen abgenommen und die Vertiefungen fünfmal mit 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Die Lumineszenzreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 μ l frisch gemischter Lumigen™PS-Substratlösung und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es wurden dann die relativen Lichteinheiten (RLU) in einem Luminometer bestimmt. Aufgrund der im Plasma

vorhandenen sogenannten Pseudoperoxidase war der Hintergrund aber höher bzw. die Empfindlichkeit des Tests geringer.

(v) *Bestimmung antagonistischer PTH-Fragmente*

5 Das antagonistische PTH-Aktivitätspotential wurde bestimmt durch Beschichten einer Mikrotiterplatte mit monoklonalem Antikörper gegen die Region hPTH(7-14). In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 1,0 µg MAk (Klon gegen hPTH (7-14)) gegeben, gelöst in 250 µl 60 mM NaHCO₃, pH 9,6, und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die MAk-Lösung in den Vertiefungen wurde entfernt und jede Vertiefung
10 fünfmal mit 200 µl Waschpuffer (PBS, pH 7.4 mit 0.05% TweenTM-20) gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 250 µl Assaypuffer gegeben. Die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Assaypuffer inkubiert, der Assaypuffer entfernt und jede Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Für die Bindung antagonistischer PTH-Fragmente wurde jeweils 100 µl
15 verdünnter EDTA-Serumüberstand in Assaypuffer eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in der Vertiefung unter Rütteln inkubiert. Die Lösung wurde aus der Vertiefungen entfernt und die Vertiefung fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen antagonistischen PTH-Fragmente-(7-37) wurden mit jeweils 100 µl affinitätsgereinigtem Kaninchen-anti-PTH(24-37)-Antiserum (1:10000
20 verdünnt in Assaypuffer mit 3% (w/v) PEG 6000) markiert, wie oben angegeben, und nach Waschen mit Waschpuffer quantitativ bestimmt durch Zugabe von 100 µl anti-Kaninchen-IgG fc-spezifisch, kreuzabsorbiert und konjugiert mit alkalischer Phosphatase (1:20 000 verdünnt in Waschpuffer) und in analoger Weise wie die aktiven PTH-Fragment durch Lumineszenz quantifiziert.

25

Die in diesem Verfahren bestimmte molare Differenz zu den biologisch aktiven PTH-Fragmenten (mit aminoterminalen PTH(1-3)-Epitop) ist dann ein Maß für das PTH-antagonistische Potential in der Probe. Das antagonistische Vermögen der PTH (4-37)-Fragmente kann dann über einen Faktor k_{ant} mit dem agonistischen Vermögen der
30 biologisch aktiven PTH-Fragmente hPTH(1-37) bzw. hPTH(1-34), hPTH(1-38), hPTH(1-37 + x) ... hPTH(1-84) in Beziehung gesetzt werden.

In der Regel wird es ausreichen, wenn die agonistischen und die antagonistischen Anteile der aminoterminalen PTH-Fragmente (d.h., aminoterminal der Aminosäure

- 38) 1:1 in Beziehung gesetzt werden. Für einige Indikationen kann es aber vorteilhaft sein, die einzelnen Anteile an biologisch aktivem hPTH(1-84), hPTH(1-mid) [mid. = PTH-Fragment mit mittregionaler Spezifität 53-68], hPTH(1-Cterm) [Cterm = PTH-Fragment mit C-terminaler Spezifität 53-84] mit den aktiven hPTH(1-33~38)-
 5 Fragmenten und den inhibierenden hPTH(4-37) zueinander in Beziehung zu setzen. Die physiologische hPTH-Aktivität kann dann im Wesentlichen wie folgt ermittelt werden.

$$PTH-Akt. = \frac{k_1 [hPTH(1-32/38)] + k_x [hPTH(1-X/mid/cterm)] + k_2 [hPTH(1-84)]}{k_3 [hPTH(4-25 \text{ bis } 84)]}$$

- 10 wobei k Faktoren für die agonistische bzw. antagonistische Aktivität der verschiedenen PTH-Fragmente sind und [hPTH(1-37)], [hPTH(1-84)], [hPTH(1-mid.)], [hPTH(1-Cterm)] und [hPTH(4-37)] die Konzentrationen der verschiedenen Fragmente in der Probe. Dabei versteht sich, dass die Bezeichnung hPTH(1-33~38) Fragmente mit 33 bis 38 Aminosäuren umfasst. In der Regel wird die Konstante k_2 für die Fragmente
 15 hPTH(1-mid), hPTH(1-Cterm) und hPTH(1-84) ungefähr gleich k , sein. Für jedes einzelne PTH-Fragment wird eine Aktivitätskonstante zu ermitteln sein, wenn die Aktivitätskonstanten $k_1, k_2, k_3 \dots$ verschieden sein sollten. Der Anteil der Fragmente mit mittregionaler und C-terminaler hPTH-Immunreaktivität und einem hPTH(1-3)-Epitop wird dann eigens zu bestimmen sein und zwar in analoger Weise wie die agonistischen
 20 und antagonistischen Fragmente des aminoterminalen Bereichs.

In der Regel wird aber nachstehende vereinfachte Gleichung den Anforderungen genügen.

$$PTH-Aktivität = \frac{k_1 [hPTH(1-32 \text{ bis } 38)] + k_2 [hPTH(1-84)]}{k_3 [hPTH(4-25 \text{ bis } 84)]}$$

25

wobei k_1, k_2 und k_3 in erster Näherung gleich gesetzt werden können.

Beispiel 5 *Diagnose von primärem Hyperparathyreoidismus*Fallstudie 1

Abklärung des Verdachts eines Hyperparathyreoidismus bei einer 57-jährigen Patientin mit Hypercalciämie. Eine Tumorhypercalciämie wurde ausgeschlossen durch O-Sono, CT-Thorax, CT-Abdomen, MRT-Abdomen, Gastroskopie und Coloskopie. Für das Vorliegen eines primären Hyperparathyreoidismus sprachen die Befunde Hypophosphaturie, leicht erhöhte cAMP-Ausscheidung, ein erhöhter Quotient von Calcium-Clearance zu Creatinin-Clearance und zudem der klinische Verlauf mit ansteigenden Calciumwerten, die Nephrocalcinose mit Niereninsuffizienz, typische Depressionen, rezidive Pankreatitis und grenzgradige Osteopathie am Schenkelhals. Zudem wäre bei einer Tumorhypercalciämie ein niedriger PTH-Spiegel zu erwarten. Die einschlägigen Laborwerte vom Plasma waren aber wie folgt:

Parameter	Messwert	Normbereich
PTH-Intakt	1,5	1,2-6 pmol/ml
PTHrP	1,8	< 2,5
25-Hydroxy-Vitamin-D ₃	50	50 bis 300 nmol/l
1,25-Vitamin-D ₃	12	30 bis 90 ng/l

PTHrP: tumortypisches PTH

Es lag somit auch keine Sarkoidose bzw. eine Vitamin-D vermittelte Hypercalciämie vor. Dafür waren die Werte für 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ und 1,25-Vitamin-D₃ zu nieder. Ein Therapieversuch mit Prednison führte zu keiner Senkung des Calciums. Zudem wäre bei einer Vitamin-D-vermittelten Hypercalciämie ein niedriger PTH-Spiegel zu erwarten.

Die Bestimmung der biologischen PTH-Aktivität mit Hilfe des erfindungsgemäßen Assays, umfassend auch die Aktivitäten der Fragmente PTH(1-34), PTH(1-37), PTH(1-38) und aminoterminaler Teil von PTH(1-84), einschließlich intakt-PTH(1-84) - nicht aber der PTH-Fragmente PTH(3-37/38) und PTH(3-84) - zeigte eine überhöhte PTH-Akti-

vität im Serum der Patientin (nämlich 37 pMol, 31 pMol, 22 pMol und 30 pMol bioaktive PTH-Fragmente pro Liter an 4 verschiedenen Tagen innerhalb eines Monats), entsprechend dem 3- bis 4-fachen der normalen PTH-Aktivität, so dass die Diagnose primärer Hyperparathyreoidismus labordiagnostisch fassbar wurde. Wegen des eindeutig erhöhten PTH-Fragments 1 bis 38 im Serum war somit von der Sekretion eines N-terminalen Fragments des PTH auszugehen, während eine Niereninsuffizienz in der Regel nicht zu einer Akkumulation von N-terminalen, sondern von mittregionalen und C-terminalen Fragmenten des PTH führt.

10 Fallstudie 2

Bei einem 48-jährigen Dialyse-Patienten mit einer Calciumstoffwechselstörung bestand Verdacht auf Hyperparathyreoidismus. Eine Sarkoidose konnte aufgrund normaler 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Spiegel ausgeschlossen werden. Der Patient war unregelmäßig hypercalcemisch. Für die Pathologie wurde eine Knochenbiopsie vorgenommen (Knochenzylinder 3 mal je 1,2 cm). Mikroskopisch war ein trabekulärer Knochen zu sehen, der stellenweise von einer leichter endostalen Fibrose begleitet war. An der Knochenoberfläche bestanden vermehrte Resorptionsspuren, zum Teil mit aktiven Osteoklasten. Die Osteoblastenaktivität war geringfügig gesteigert. Es bestand keine stärkergradige Osteoidbildung. Der Knochen war zumeist lamellär aufgebaut. In den Markräumen war hämatopoetisch aktives Knochenmark.

Es lag somit scheinbar eine Osteopathie vom Typ eines Hyperparathyreoidismus vor. Die Osteopathie war aktiv. Der bisher eingetretene Umbau gering. Für eine Mineralisationsstörung (Osteoidose, Osteomalazie) bestand kein Anhalt. Gleichfalls bestand kein Anhalt für ein Plasmozytom. Nichtsdestotrotz waren die gemessenen Werte an intaktem PTH nicht erhöht. Die Laborwerte waren wie folgt:

	Zeit	Ca mmol/l	Phos mg/dl	Produkt <4,5	PTH 12-72 pg/ml	AP	Knochen U/l	1,25-Vit.D ng/l	25-VitD nmol/l
	04.12.00	2,79	2,80	2,52					
	27.11.00	2,64	3,52	3,00					
	20.11.00	2,39	2,47	1,90					
5	15.11.00	2,43	3,44	2,70		247			
	30.10.00	2,84	4,17	3,82					
	23.10.00	2,88	4,76	4,43					
	16.10.00	2,80	6,72	6,08	0	273	65		
	09.10.00	2,95	5,41	5,15					
10	06.10.00				0			36,0	293,0
	02.10.00	2,47	6,31	5,03					
	19.09.00	2,96	6,01	5,74					
	29.08.00	2,70	3,26	2,84					
	15.08.00	3,14	5,87	5,95					
15	18.07.00				1		115		
	18.07.00	3,11	6,89	6,92		320			
	20.06.00	2,49	5,19	4,17					
	16.05.00	2,23	3,44	2,48					
	18.04.00	2,27	2,63	1,93		241			
20	07.04.00				5		86		
	16.11.99	2,25	3,04	2,21					
	19.10.99	2,38	3,23	2,48	7	234			
	21.09.99	2,14				224			
	09.04.97	2,30				174			
25	09.04.97	2,30				174			

Wegen dieses Befunds war eine partielle Parathyreoidektomie empfohlen worden. Der erfindungsgemäße Immunoassay der biologisch wirksamen PTH-Aktivität zeigte auf, dass auch insgesamt keine erhöhte PTH-Aktivität vorlag, so dass die chirurgischen Behandlung zurückgestellt werden konnte.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung der Parathormon-Aktivität in einer Probe,
5 gekennzeichnet durch die Schritte:
Umsetzen einer Probe mit einem Antikörper, der ein Epitop erkennt
im Bereich der Rezeptorbindungsstruktur des Parathormons;
Umsetzen der Probe mit einem Antikörper, der ein Epitop erkennt, das
von den N-terminalen Aminosäuren 1 bis 3 des Parathormons gebildet wird
10 und die N-terminale Aminosäure enthält;
Bestimmen der Zahl der Moleküle, die von beiden Antikörpern erkannt
werden; und/oder
Berechnen der wirksamen Parathormon-Aktivität aus der Zahl der
Moleküle in der Probe.
15
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein Antikörper an den Bereich zwischen
Aminosäure 15 und 22 des humanen Parathormons bindet.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 oder 2, wobei ein Antikörper an eine feste Phase
20 gebunden ist und der andere Antikörper eine Markierung trägt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Bindung der beiden
Antikörper in Gegenwart von 0,05 bis 0,1 Gew.% eines leichten Detergens
erfolgt.
25
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei ein bekanntes Aliquot der
Probe mit zwei Antikörpern umgesetzt wird, die an die Parathormon-Sequenzen
zwischen Aminosäure 4 bis 14 und 15 bis 37 binden.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Zahl der Moleküle
in einer Probe, die von den Antikörpern gegen das Epitop mit den Aminosäuren
1 bis 3 und die Rezeptorbindungsstelle des Parathormons gebunden werden,
und die Zahl der Moleküle, die von Antikörpern gegen die Parathormon-
Regionen zwischen den Aminosäuren 4 und 14 beziehungsweise 15 bis 37

gebunden werden, zur Bestimmung der physiologisch wirksamen Parathormon-Aktivität zueinander in Beziehung gebracht werden.

- 5 6. Diagnosesystem zur Bestimmung der Parathormon-Aktivität in einer Probe, gekennzeichnet durch Antikörper, die spezifisch das Parathormon-Epitop mit den Aminosäuren 1 bis 3 erkennen und Antikörper, die an den Bereich der Rezeptorbindungsstelle des Parathormons binden.
- 10 7. Diagnosesystem nach Anspruch 8, das weiterhin beinhaltet Antikörper, die spezifischen an den Bereich zwischen Aminosäure 4 und 14 des Parathormons binden.
- 15 8. Diagnosesystem nach Anspruch 6 oder 7, das weiterhin beinhaltet Antikörper, die spezifisch an Bereich zwischen Aminosäure 24 und 37 des Parathormons binden.
- 20 9. Verfahren zur Diagnose und Ausmaß eines Hypo- oder Hyperparathyreoidismus, dadurch gekennzeichnet, dass das in den Ansprüchen 1 bis 6 beanspruchte Verfahren zur Bestimmung der PTH-Aktivität in einer Probe zur Anwendung gelangt.
- 25 10. Verfahren zur Ursachenfindung von Calciumstoffwechselstörungen, Osteopathien, Nierenversagen und Erkrankungen, die von einer gestörten Homeostase des Calcium- und Phosphatgehalts des Bluts herrühren, dadurch gekennzeichnet, dass das in den Ansprüchen 1 bis 6 beanspruchte Verfahren zur Bestimmung der PTH-Aktivität in einer Probe zur Anwendung gelangt.

1 / 4

FIG. 1A

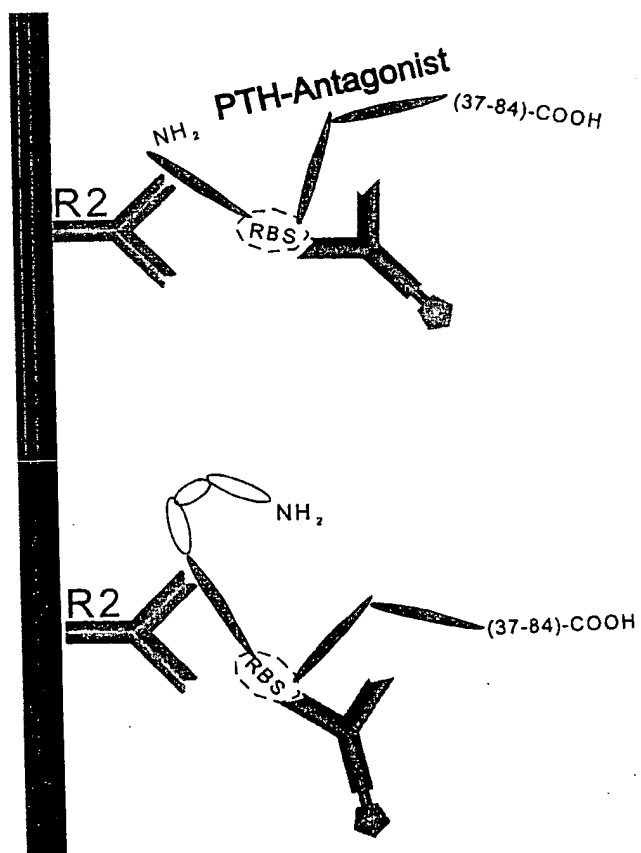
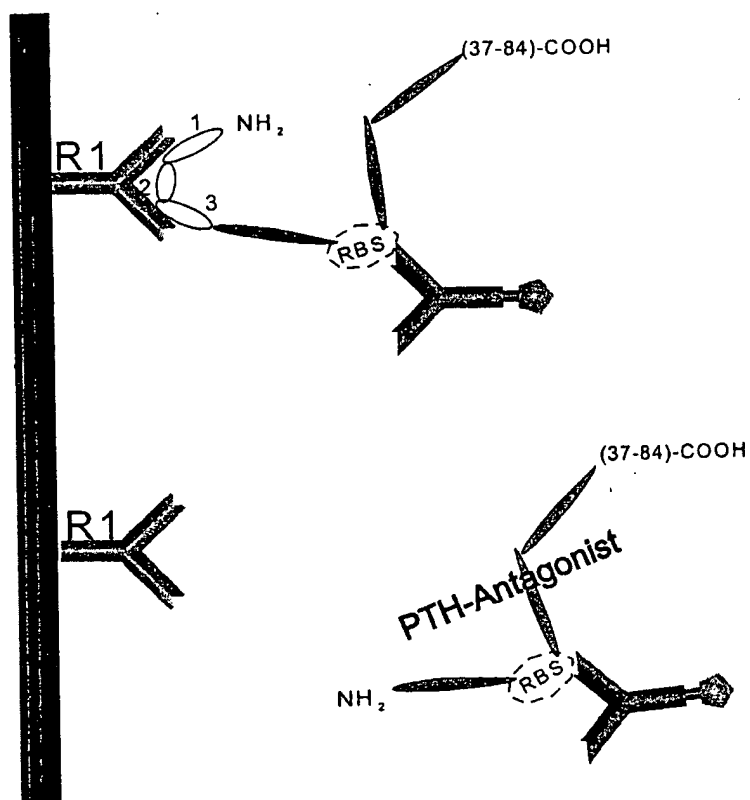


FIG. 1B



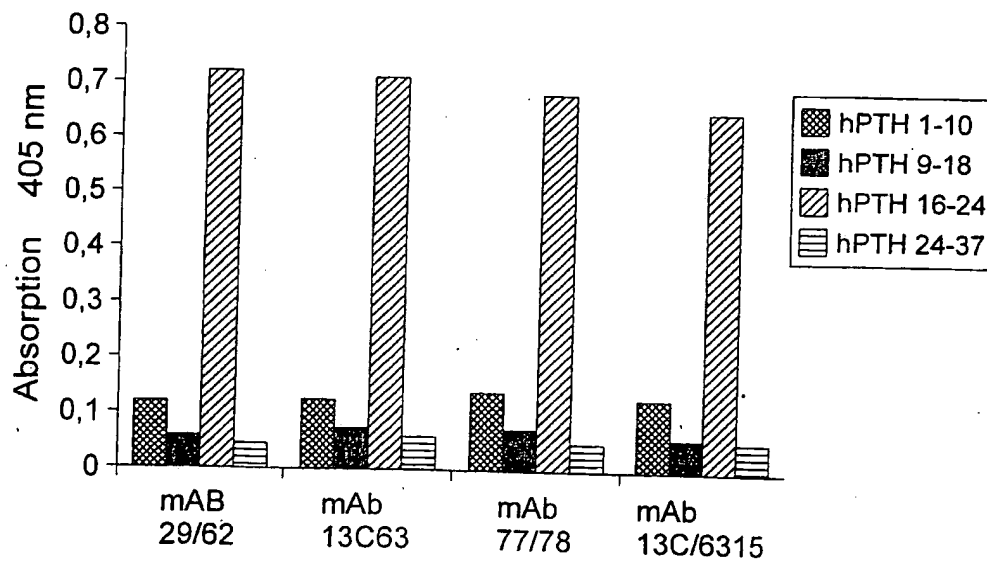
2 / 4

Fig. 2

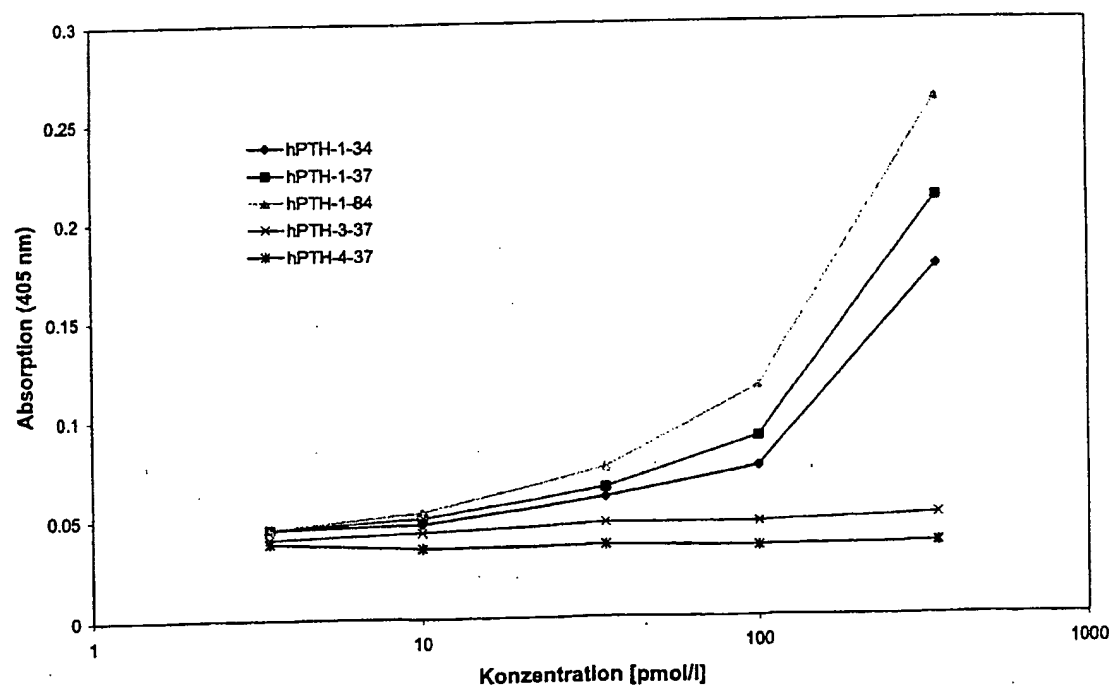
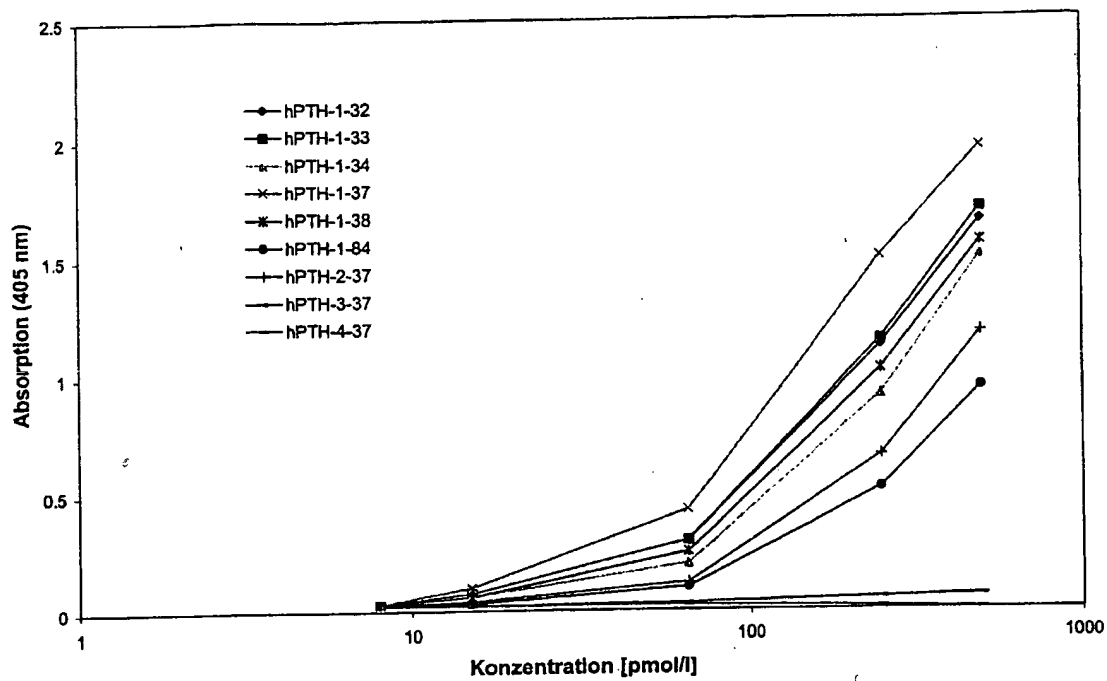
	123	15	22	
				REZEPTOR
Mensch:	SVS	EQIMHNLGKH	<u>LNSMERVE</u>	WLRKKLQDVHNFVAL
Rind:	AVS	EQFMHNLGKH	LSSMERVE	WLRKKLQDVHNFVAL
Ratte:	AVS	EQIMHNLGKH	LASVERMQ	WLRKKLQDVHNFVSL
Schwein:	SVS	EQIMHNLGKH	LSSLERVE	WLRKKLQDVHNFVAL
Hund:	SVS	EQFMHNLGKH	LSSMERVE	WLRKKLQDVHNFVAL

FIG. 3

Kreuzreaktivität und Epitope der mAK



3 / 4



4 / 4

FIG. 5

